



Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2015

Hjulsager, Charlotte Kristiane; Krog, Jesper Schak; Madsen, Jesper J.; Thorup, Kasper; Larsen, Lars Erik

Publication date:
2016

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Hjulsager, C. K., Krog, J. S., Madsen, J. J., Thorup, K., & Larsen, L. E. (2016). *Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2015*. Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet.

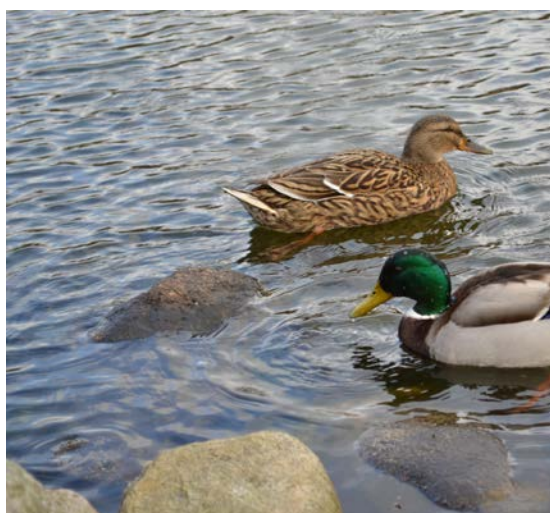
General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2015



April 2016

Charlotte K. Hjulsager, Jesper S. Krog, Jesper J. Madsen, Kasper Thorup, Lars E. Larsen.

Denne rapport beskriver resultaterne der er opnået i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2015". Overvågningen er udført af DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) i samarbejde med Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum (SNM).

En stor tak rettes til indsamlerne af prøver fra vilde fugle i naturen, herunder de frivillige ringmærkere. Vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Klosterheden Vildt og Alpevej Vildtbehandling takkes for nedlagt fjervildtprøver. Private borgere takkes for så vidt angår døde fugle til den passive overvågning for fugleinfluenza.

Endvidere takkes laboranter og dyrlæger i PCR-diagnostik og Agensdiagnostik i Sektion for Diagnostik og Beredskab, og i Sektion for Virologi, for omhyggelig udførelse af laboratorieundersøgelserne.

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2015

28. april 2016

Rapport, final version 8. juni 2016.

Af

Charlotte K Hjulsager, DTU Veterinærinstituttet

Jesper S Krog, DTU Veterinærinstituttet

Jesper J Madsen, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Kasper Thorup, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Lars E Larsen, DTU Veterinærinstituttet

Copyright: Hel eller delvis gengivelse af denne publikation er tilladt med kildeangivelse.

Forsidefotos: Gråænder, grågås af Nana Hjulsager Mathiesen (øverst). Prøveudtagelse til den passive overvågning for AI, DTU-VET (nederst).

Udgivet af: Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Bülowsvej 27, 1870 Frederiksberg C.

Sammenfatning og konklusion

Overvågningen af aviær influenza (AI) virus i vilde fugle i Danmark i 2015 blev udført i samarbejde mellem Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet (DTU-VET), Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet (SNM) i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2015" (bilag 4).

Overvågning af AI på EU niveau går tilbage til 2002, og Danmark er underlagt EU kommissionens bestemmelser for udformning af overvågningen, der dog har skiftet gennem årene i takt med indhøstede erfaringer.

I 2015 blev der udført passiv overvågning af døde vilde fugle, der blev fundet i naturen. Der blev testet 37 fugle, hvoraf der blev påvist influenza A virus i en gråand fra Guldborgsund kommune, som ikke var H5 eller H7 subtype. Virus kunne ikke dyrkes i æg og blev ikke karakteriseret yderligere.

I den aktive overvågning af levende vilde fugle blev der i alt testet 973 fugle som 264 pools eller enkeltdyrprøver af kloaksvabere fra op til 5 fugle af samme art, fundet på samme sted og på samme tid. I lighed med proceduren i 2013 og 2014, blev prøverne udtaget fra enkeltdyr og sendt til laboratoriet, hvor de blev poollet inden test. Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Lolland, Sjælland og i Hovedstadsregionen. Frekvensen af positive pools var højst på Fyn og betydeligt lavere i Hovedstadsområdet end de øvrige steder. FVST varetog udtagelse af prøver der blev testet fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food (100 fugle), Alpevej Vildtbehandling (100 fugle) og Klosterheden Vildt (294 fugle). Der blev testet prøver fra 479 vildtlevende fugle indleveret af Statens Naturhistoriske Museum (SNM).

Prøverne blev testet for AI virus på DTU-VET. I alt 72 (27 %) af prøverne blev fundet positive for AI virus ved PCR. Af de positive prøver var 20 (28 %) LPAI H5 og 1 (1 %) LPAI H7. Andelen og antallet af positive prøver i 2015 var på niveau med 2013 og 2014, mens andelen af H5 positive prøver var på niveau med 2013 men højere end i 2014. Antal af H7 positive prøver var på niveau med tidligere år. AI virus kunne dyrkes fra 11 (15 %) af de PCR positive pools, hvilket er på niveau med de tidligere år.

Ved subtypning af AI virusisolaterne fra de vilde fugle blev der fundet virus med subtyperne H1N1 (n=2), H3N8 (n=1), H5N3 (n=1), H6N2 (n=4), H6N8 (n=1) og H10N1 (n=1), samt et virusisolat der kun blev karakteriseret som AI ikke af H5/H7 subtyperne. Alle isolaterne var fra svømmeænder, og repræsenterer tidligere påviste subtyper og subtyperne H3N8, H4N6 og H6N2 er de subtyper, der oftest påvises i vilde fugle i den danske overvågning.

Prøverne blev ikke specifikt testet for tilstedeværelsen af paramyxovirus (PMV), men ved dyrkning i æg for at isolere AI virus fra AI PCR positive prøver, blev der isoleret PMV fra 5 prøver. Ligesom de foregående år viste mange af prøverne sig at indeholde en blanding af flere virus, enten flere AI virus og/eller både AI og PMV virus.

Fylogenetisk analyse af H5 gener fra virus påvist i 2015 viste, at disse var nært beslægtede med H5 gener fra virus i prøver fra vilde fugle, der blev indsamlet i Danmark de foregående år. De var ikke nært beslægtet med H5N8 HPAI fundet i Europa i 2014. Det var ikke muligt at udføre en fylogenetisk analyse af H7 genet fra den ene prøve, der blev subtypet som H7 LPAI, formentlig fordi prøven var svagt positiv. Baseret på den sparsomme sekvens omkring kløvningssitet, var der ikke basis for at antage at virus var nært beslægtet med de H7N9 LPAI virus fra Kina, der smitter fra fugle til mennesker.

Sekventering af H5 gener gav mulighed for at undersøge, hvor godt de anvendte RT-PCR assays, som er de samme der anvendes til diagnostik, matcher nutidige AI virus. Resultaterne fra analysen af de tre H5 specifikke RT-PCR assays viste, at de overordnet set er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, men for nogle af de anvendte tests var der kritisk mange mutationer i primer og/eller probe regionen. Dette understreger at det i rutinediagnostikken er nødvendigt at kombinere assays for at sikre påvisning af hele spektret af H5 virus. Endvidere understreger analysen vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov.

Som supplement til den validering af tørsvabere der blev gennemført i 2014, gennemførtes en indsamling af tørsvabere parallelt med almindelige "våde" svabere udtaget i kloakmedie. I modsætning til 2014, blev tørsvaberne udtaget inden en parallel våd svaber fra samme fugl. Sammenligningen viste at sensitiviteten var lavere ved anvendelse af tørsvabere og det anbefales derfor at anvende våde svabere i den fremtidige overvågning.

Formålet med den aktive overvågning var at foretage en screening for LPAI virus og at karakterisere de identificerede virus. Som de foregående år, viste resultaterne fra overvågningen i 2015, at fuglearten er den mest betydende faktor for, at en given prøve er positiv. Den største andel af positive prøver (> 10 %) blev som tidligere år fundet i svømmeænder og hyppigst hos krikand, gråand, spidsand samt pibeand.

I lighed med 2014, var overvågningen i 2015 udvidet med en molekylær karakterisering af de virus, der blev påvist både i vilde fugle og i fjerkræ, og dette bidrog til en dybere og mere præcis karakterisering af virus, så vi ret præcist ved hvilke virus varianter, vi har påvist. Dermed er opnået en god indikation af hvilke AI virus, der cirkulerer i Danmark, og en viden om at disse virus pt. ikke udgør en øget trussel mod den humane sundhed. Overvågningen viser dog, at der til stadighed cirkulerer LPAI H5 og H7 virus i den vilde fauna, som potentielt kan true dyresundheden, så der er fortsat et behov for at overvåge forekomsten af AI virus i fjerkræflokke. Karakterisering af virus fra gentagne indsendelser af opdrættet fjervildt understreger nødvendigheden af en løbende test af gråandebesætninger, da virus kan persistere i længere tid i besætningerne, hvilken er en velkendt risikofaktor for udvikling af HPAI fra LPAI med subtyperne H5 og H7.

Indholdsfortegnelse

Sammenfatning og konklusion	3
Indholdsfortegnelse.....	5
Introduktion.....	6
Baggrund	6
Formål.....	8
Materialer og metoder	9
Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle.....	9
Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle	9
PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse	9
Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse	9
Resultater og diskussion.....	10
Passiv overvågning - døde vilde fugle.....	10
Aktiv overvågning – levende vilde fugle.....	11
Prøver	11
PCR resultater	12
Virusisolater.....	15
Prøver indeholdende flere virus	15
Sammenligning med resultater fra tidligere år	15
Molekylær karakterisering af AI virus fra vilde fugle.....	16
H5 evaluering af diagnostiske assays	16
H5 diversitet	16
H7 diversitet	18
H9 virus.....	18
Tørsvabervalidering.....	18
Molekylær karakterisering af AI virus fra fjerkræ	20
Referencer	22
Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning	24
Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning	25
Bilag 3. Virusisolatoversigter	26
Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 PCR assays.....	27
Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2015.	28

Introduktion

Baggrund

Aviær influenza (AI) er en smitsom virusinfektion, som kan angribe alle fuglearter, og som er forårsaget af influenza A virus.

Influenza A virus tilhører *Orthomyxoviridae* virusfamilien og har et negativ-sense, enkeltstrengt, segmenteret RNA genom. Influenza A virus kan inficere mange værtsarter inkl. mennesker, grise, heste og fugle. Vilde fugle af ordenerne *Anseriformes* (ænder, gæs og svaner) og *Charadriiformes* (måger, terner og vadefugle) menes at udgøre det naturlige reservoir for influenza A virus (Verhagen et al. 2011).

Influenza A virus udviser en stor diversitet. Mest udtalt er den genetiske og antigene variation af overfladeproteinerne hæmagglutinin (HA) og neuraminidase (NA). Virus klassificeres ud fra den antigene variation af disse HA og NA proteiner. I fugle kendes 16 hovedvarianter af HA og 9 varianter af NA. De findes i mange kombinationer, og disse såkaldte virussubtyper (f.eks. H1N1, H5N1 og H7N3) anvendes i influenza A virus klassifikation og nomenklaturen. AI virus kan yderligere klassificeres på baggrund af deres patogene fænotype i kyllinger. Højpatogen aviær influenza (HPAI) er en akut systemisk sygdomstilstand i fjerkræ, hvor mortaliteten kan være op til 100 %. HPAI er med meget få undtagelser begrænset til virus af subtyperne H5 og H7, men det er ikke alle H5 og H7 virus, der er højpatogene. Alle andre aviære influenzavirus er lavpatogene (LPAI), og forvolder mildere eller ingen sygdom (Verhagen et al. 2011). Udvikling af sygdom efter infektion med AI virus er værtsafhængig, således at et givent virus i nogle arter giver kliniske symptomer, mens det i andre arter giver mildere symptomer eller slet ingen. LPAI virus forekommer enzootisk hos vilde fugle og mens kun få HPAI virus er enzootisk forekommende (f.eks. H5N1) (Alexander, 2000a).

Udbrud af HPAI i fjerkræ kendes tilbage til 1959, hvor det første udbrud med HPAI H5N1 blev påvist i høns i Skotland. Frem til omkring 2003 var der ca. 20 udbrud i tamfjerkræ med HPAI H5 eller H7 virus på verdensplan. Frekvensen af udbrud har siden været stigende. De fleste udbrud har været i høns og har typisk involveret fra tusindvis til millioner af dyr (Alexander, 2007). I 2003 ændrede situationen sig imidlertid dramatisk, idet HPAI H5N1 af asiatisk oprindelse blev enzootisk forekommende i dele af Asien og bredte sig til Europa og Afrika, hvor virus har været årsag til udbrud i vilde fugle og/eller fjerkræ i over 60 lande, heraf 24 europæiske (Cattoli et al. 2009). Udover at være et problem i fjerkræproduktionen, anses HPAI H5N1 virus for at være en betydelig human trussel med mere end 400 fatale tilfælde og en frygt for, at dette virus vil kunne udvikle sig til et virus med pandemisk potentiale (Capua og Alexander, 2007).

Ved udbrud af HPAI i fjerkræ, især i tamænder der opdrættes på friland, vil der være risiko for overførsel til vildfugle populationen (Alexander 2007) og virus kan potentielt spredes over store afstande af vilde fugle, især hvis de ikke eller kun i ringe grad er klinisk syge (Keawcharoen et al. 2008).

LPAI virus kan mutere til HPAI virus. Aminosyre sekvensen omkring HA kløvningsstedet er afgørende for patogeniteten, men konstellationen af de øvrige gener og individuelle genmutationer spiller ligeledes en rolle (Hatta et al. 2001; Stech et al. 2009). De faktorer der medfører transition fra LPAI til HPAI kendes ikke. I nogle tilfælde ser det ud til at virus har muteret fra LPAI til HPAI umiddelbart efter introduktion af LPAI til fjerkræ, mens LPAI virus i andre tilfælde har cirkuleret i månedsvis før den/de nødvendige mutationer er sket (Banks et al. 2001). Det er således rimeligt at antage, at risikoen for, at ændringen fra LPAI til HPAI vil

ske, afhænger af hvor længe og hvor mange LPAI virus der cirkulerer i en flok (Alexander, 2007). Dermed er det en uønsket situation at have LPAI H5/H7 virus cirkulerende i fjerkræflokke, og således er det vigtigt at undgå introduktion af LPAI H5/H7 virus. Hvis introduktion sker, er en hurtig diagnose og effektiv bekæmpelse f.eks. ved depopulation af yderste vigtighed. Vilde fugle er i nogle tilfælde identificeret som en mulig kilde til introduktion af virus til fjerkræflokke (Alexander, 2007). Dette kan ske enten ved direkte kontakt eller indirekte kontakt, hvor andre dyrearter eller mennesker mekanisk har båret virus ind i flokken. Denne sekundære transmission af virus er i nogle større udbrud af AI, kædet sammen med bevægelse af personale og materiel mellem besætninger. Virus er stabilt i miljøet og kan overleve i længere tid i f.eks. overfladevand, som dermed udgør en kilde til virus og bidrager til cirkulation af virus i bestanden af vilde fugle, især svømmefugle (Alexander, 2007).

LPAI virus kan inddeles i to fylogenetiske hovedlinjer: den eurasiske og den amerikanske linje. Denne opdeling af influenzavirus kan forklares ud fra den geografiske og økologiske adskillelse af fugle der benytter trækruter enten over Europa/Asien/Afrika/Australien eller Amerika (Munster and Fouchier, 2009; Verhagen et al. 2011). Ud over den geografiske opdeling af AI virus ses også en opdeling baseret på værtspopulationer. Et eksempel herpå er H13 og H16 subtyper der primært isoleres fra måger og terner (*Charadriiformes*) (Fouchier et al. 2005). Disse AI virus har udviklet sig til separate genetiske linjer, der er forskellige fra AI virus af subtyperne H1 – H12 der primært findes i ænder (*Anseriformes*) (Munster et al. 2007).

H9N2 virus er enzootisk forekommende i forskellige typer af terrestrisk fjerkræ flere steder på det euroasiatiske kontinent, nogle gange med øget sygelighed. Dette virus blev første gang påvist i Guangdong provinsen i Kina i 1994. Smitte til mennesker med dødelig udgang er forekommet og virus har doneret interne gener til zoonotiske influenzavirus H7N9 og H10N8.

Virus med subtypen H7N9 kendes fra tidligere, men i marts 2013 blev en særlig H7N9 variant, i det efterfølgende benævnt "H7N9-2013-China", fundet i Kina. Dette specifikke virus kendtes ikke fra tidligere men påvises nu jævnligt i fugle i Kina. Virusset er lavpatogent i fjerkræ, men der har været mere end 752 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af infektion, primært i Kina, heraf mere end 295 med dødelig udgang. For humane cases kan der oftest linkes til forudgående kontakt med inficeret fjerkræ eller miljø, og vedvarende human-human smitte kendes ikke, men virus har pandemisk potentiale (www.who.int).

I starten af 2014 blev der rapporteret udbrud af et nyt euroasiatisk H5N8 virus i trækfugle og fjerkræ i Kina, Japan og Korea. Dette virus er højpatogent i fjerkræ og er et reassortment med H5 fra clade 2.3.4.4 HPAI. Der har ikke været rapporter om at dette virus har forårsaget sygdom i mennesker eller andre pattedyr. Siden november 2014 er dette virus rapporteret fra både vilde fugle og fjerkræ i EU (Tyskland, Holland, UK, Sverige, Italien, Ungarn). Genetiske undersøgelser af virus fra både vilde fugle og fjerkræ peger på en rolle for vilde fugle i spredningen af virus. Det er imidlertid uklart, hvordan virus er spredt fra Asien til Europa, og der er ikke velkendte direkte øst-vest trækruter for vilde fugle. Fund af virus i indgående fjerkræflokke i EU, hvor direkte kontakt med vilde fugle anses for negligerbar, tyder på indirekte spredning fra et kontamineret miljø til denne sektor, og at disse virus kan overleve i miljøet. H5N8 virus er også fundet i USA, og efterfølgende er reassorterede HPAI H5N2 og H5N1 virus med amerikansk linje gener i kombination med gener fra det euroasiatiske H5N8 virus, herunder med clade 2.3.4.4 H5 genet, rapporteret fra Canada og USA (www.offlu.net). Reassorterede clade 2.3.4.4 H5 HPAI virus med andre N typer (H5N5, H5N6) er ligeledes fundet i Asien. Der er rapporteret om enkelte fatale humane tilfælde med H5N6 HPAI virus i Kina (www.who.int/influenza/human_animal_interface/). Dette virus har også pandemisk potentiale.

Siden 2003 er mere end 850 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af smitte med H5N1 virus fra 16 lande indrapporteret til WHO, heraf 449 med dødelig udgang (who.int). For nylig er der observeret en opblomstring af tilfælde i Egypten, men de fleste tilfælde er fra Asien, især Indonesien og Vietnam.

I 2015 har der været flere udbrud af H5 HPAI i fjerkræ i Frankrig, både H5N1, H5N2 og H5N9, og primært i andeproduktionssegmentet. Der har i den forbindelse ikke været rapporteret om human smitte. Derudover er der bl.a. rapporteret om HPAI H7N7 i fjerkræ i Tyskland og England. Endvidere er der set kliniske tegn i kalkunbesætninger inficeret med subtypen H6N8 i Italien, med en IVPI score på ca. 1. Dette er interessant, da det tyder på at denne subtype ligesom H5 og H7 kan optræde patogent i nogle fuglearter.

Formål

Formålet med AI overvågningen i vilde fugle i Danmark er at sikre en tidlig påvisning af HPAI og at belyse vilde fugles rolle i spredningen af AI virus. Overvågningen udføres som en virologisk screening, der primært er rettet mod AI virus med subtyperne H5 og H7. Fund af andre virus i vilde fugle subtypes så vidt muligt. Via den molekylære karakterisering af de virus der påvises i vilde fugle i den danske fauna, og fjerkræ der opdrættes på dansk grund, opnås en mere præcis karakterisering af virus end blot på subtype niveau, fx til hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af H7N9-2013-China like virus. De molekylære analyser frembringer ligeledes værdifulde data til en løbende evaluering af egnetheden af de molekylærdiagnostiske assays, der anvendes til at undersøge mistanker om AI i fjerkræ. Dette er en stadig nødvendighed, da AI virus konstant muterer. Kortlægning af andre subtyper udover H5/H7 giver en øget viden om forekomsten af virus af andre subtyper under danske forhold, hvilket er vigtigt i forhold til at være forberedt på nye emerging AI virus.

AI overvågningen i vilde fugle i Danmark i 2015 bestod af:

1) Passiv overvågning.

Overvågning for HPAI i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens afgørelse af 25. juni 2010 (2010/367/EU), bilag II. Målgruppen af fugle er angivet i artslisten (http://eur-lex.europa.eu/Result.do?T1=V4&T2=2010&T3=367&RechType=RECH_naturel&Submit=S%C3%B8g)

FVST indberettede laboratorieresultaterne fra den passive overvågning til EU kommissionen i måneden efter et halvår, dvs. i juli 2015 og i januar 2016.

2) Aktiv overvågning.

En national aktiv overvågning for LPAI virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.

3) Molekylær karakterisering.

Udvalgte virus og gener fra 1) + 2) samt fjerkræbesætninger i forbindelse med AI mistanker og virologisk overvågning af opdrættet fjervildt blev karakteriseret molekylært med fokus på karakterisering af H5 og H7 virus.

4) Validering af tørre svabere til prøveindsamling.

Indsamling af prøver til validering af anvendelsen af tørre svabere som alternativ til at udtage svaberprøver direkte i AI kloak(flerstyrke)-medie i felten.

Materialer og metoder

Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle

Kadavere af fugle fundet døde i naturen blev indsendt til DTU-VET, hvor der blev udtaget kloaksvabere og/eller trachealsvabere i AI kloak(flerstyrke)medie hhv. enkeltstyrkemedie til analyse for AI virus. Svaberne blev testet enkeltvist eller som pools af kloak- og svælgsvaber fra den samme fugl udtaget i kloakmedie. Laboratoriesvar blev sendt til indsender med kopi til FVST, Dyresundhed. Fuglene og de tilhørende laboratorieresultater blev ligeledes løbende registreret i FVST's offentligt tilgængelige fugleinfluenza database (http://webgis-a.le34.dk/fi/oversigt_offentlig.php).

Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle

Til den aktive overvågning af raske vilde fugle blev der indsamlet kloaksvaberprøver fra vilde fugle, som i det efterfølgende er opdelt i to kategorier baseret på indsamlingsmetoden:

1) Nedlagt fjervildt. FVST varetog udtagelse af prøver fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food (100 fugle), Alpevej Vildtbehandling (100 fugle) og Klosterheden Vildt (294 fugle). Prøverne blev udtaget over hhv. 2, 2 og 7 gange i perioden 16. september - 10. december 2015, og indsendt på køl til DTU Veterinærinstituttet med Dianovas transportservice.

2) Levende fugle. SNM koordinerede udtagelse af prøver fra vildtlevende fugle, der enten blev fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning eller nedlagt ved jagt samme dag, som prøverne blev taget. Prøverne blev udtaget som kloaksvabere i kloak(flerstyrke)medie og indleveret eller indsendt med Post Danmark til DTU-VET på køl.

Prøver fra op til 5 fugle af samme art og udtaget på samme tid og sted, blev poolet på laboratoriet før test. Alle prøver blev undersøgt på DTU-VET med laboratoriemetoder udført i henhold til den diagnostiske manual for aviær influenza, EU direktiv 2005/94/EF, med mindre andet er angivet.

PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse

Alle prøver blev indledningsvist screenet for tilstedeværelsen af Influenza A virus med real-time RT-PCR målrettet matrix-genet. Influenza A virus positive prøver blev subtypet med specifik RT-PCR (real-time og/eller konventionel RT-PCR) mod H5 og H7 subtyperne. H5 og H7 positive prøver blev herefter testet med specifik real-time RT-PCR for N1 subtypen. H5 og H7 positive prøver blev ligeledes konfirmeret ved sekventering henover HA-kløvningsstedet, og sekvensen blev anvendt til bestemmelse af patogeniciteten som hhv. lavpatogen AI virus (LPAI) og højpatogen AI virus (HPAI). Udvalgte prøver, på basis af Ct-værdien i matrix-gen assayet, og som ikke var H5/H7 positive, blev subtypet ved sekventering direkte på primærmaterialet med in-house protokoller med primere modificeret fra Hofmann et al. (2001).

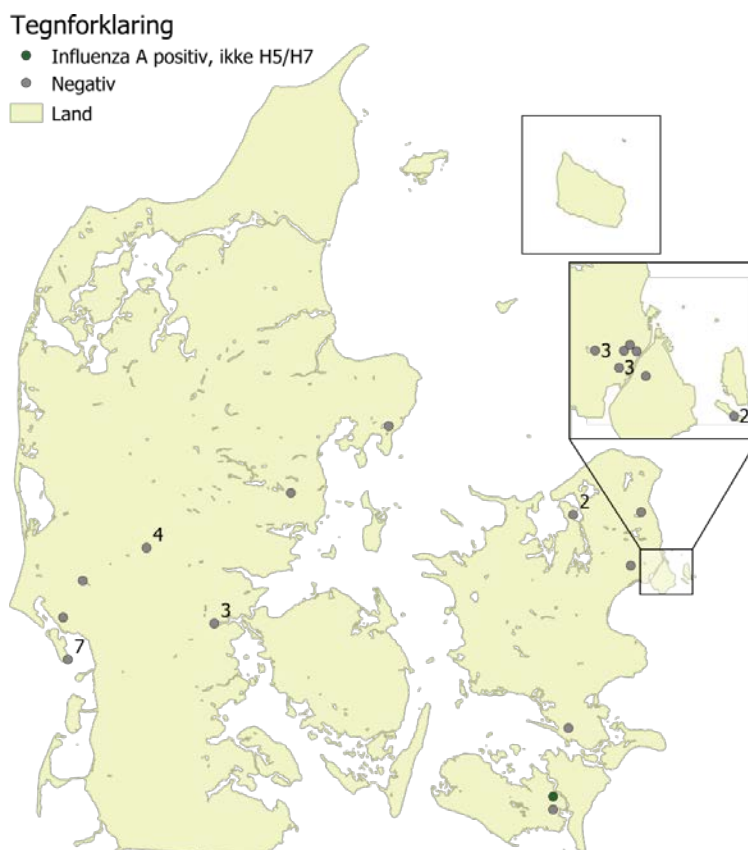
Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse

Alle prøver, der var PCR positive for AI virus, blev podet i embryonerede hønseæg med det formål at isolere virus. AI virusisolater blev påvist ved pan-AI RT-PCR, og H og N subtypet ved anvendelse af hæmagglutinations inhibitionstest (HI-test) og neuraminidase inhibitionstest (N-test), og/eller ved sekventering af HA og NA generne med in-house protokoller med primere modificeret fra Hofmann et al. (2001). I de fleste tilfælde hvor virusisolaterne ikke var AI, blev isolaterne testet med RT-PCR for PMV1 og evt. ved HI-test overfor paramyxovirustyperne PMV1-9.

Resultater og diskussion

Passiv overvågning - døde vilde fugle

Som led i den passive overvågning for AI virus, blev der testet 37 fugle, som var fundet døde i naturen (figur 1). Kadaverne af 12 svaner, 8 ænder, 3 grågæs, 7 måger, 1 strandskade, 5 rovfugle og 1 skade indsendt eller visiteret til DTU-VET af Veterinærenhederne (n=27) eller som faldvildt (n=10) af private indsamlere indgik i overvågningen (bilag 1). En pool af kloak- og svælgsvaber fra en gråand fundet i Guldborgsund kommune var positiv for influenza A virus, men ikke H5/H7 subtype. Der kunne ikke dyrkes virus fra prøven i æg. De øvrige prøver var negative for AI virus.



Figur 1. Passiv overvågning af AI i Danmark 2015. Indsamlingssteder på postnummerniveau for de testede fugle er markeret på kortet. Tallene angiver hvis flere fugle er undersøgt fra samme lokalitet. Detaljerede oplysninger fremgår af bilag 1.

Antallet af vilde fugle i den passive overvågning har været faldende de senere år og kun med enkelte fund af LPAI virus, hvilket afspejler en periode uden fund af HPAI i EU. I 2015 er der imidlertid en lille stigning i antallet af undersøgte fugle (tabel 1), som formentlig skyldes påvisning af HPAI H5N8 i flere europæiske lande i slutningen af 2014, både i vilde fugle og fjerkræ. De fleste fugle (22 ud af 37) i den danske passive overvågning 2015 var fra 1. kvartal.

Tabel 1. Oversigt over den passive overvågning af AI i Danmark 2009-2015.

Døde vilde fugle	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Antal fugle	83	56	33	18	10	10	37
AI virus PCR positive prøver	1	3	1	2	0	0	1
H5/H7 positive prøver (LPAI)*	1	0	0	0	0	0	0
Antal AI virus isolater	0	1	1	0	0	0	0

**der er ikke fundet HPAI i den passive overvågning siden 2006.

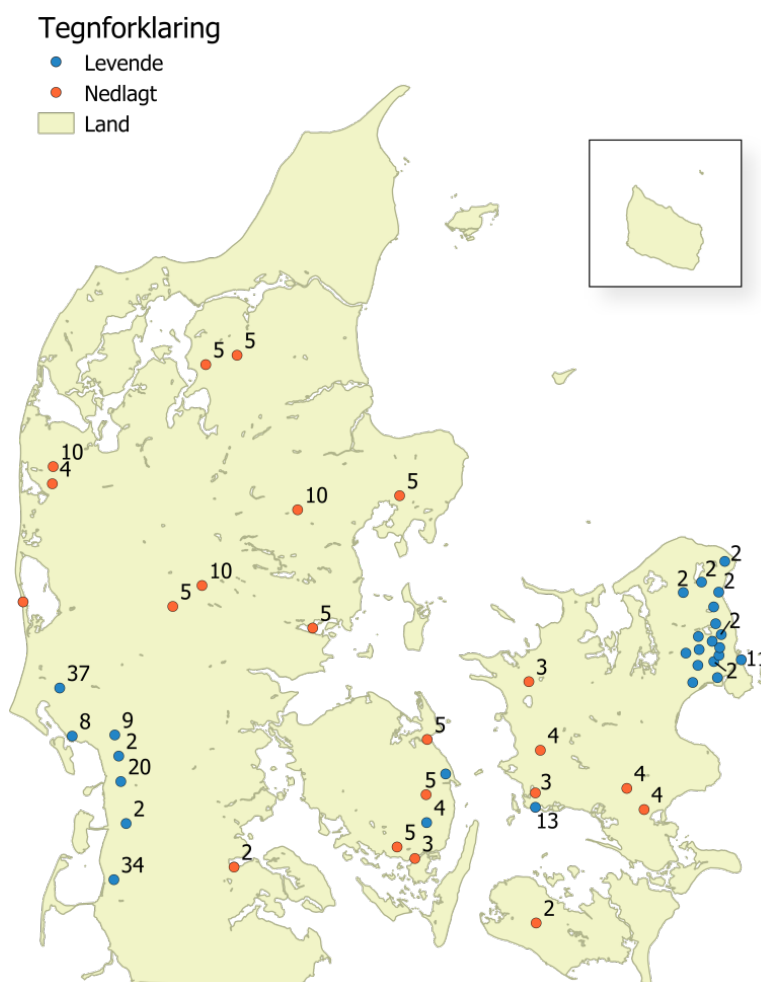
Aktiv overvågning – levende vilde fugle

Prøver

Indsamlingen var målrettet de arter, som bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle fra fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til fugleinfluenza (jf. EU kommissionsafgørelsen nr. 367 af 25. juni 2010), hvilket primært er vandfuglearter. Der blev gjort en særlig indsats for at få flere fugle fra Jylland og færre fra Hovedstadsregionen, og fra flere gæs. Der blev indsamlet prøver fra vilde fugle indleveret på vildthåndteringsvirksomheder ("Nedlagt fjervildt") og fra raske vilde fugle i naturen ("Levende fugle").

I kategorien "nedlagt fjervildt" blev der indsamlet kloaksvaberprøver fra 494 fugle (462 gråænder, 25 krikænder, 3 grågæs og 4 sneppefugle) med nedskudssteder geografisk fordelt som vist i figur 2. Fuglene var skudt ved jagt og indleveret på vildthåndteringsvirksomhed, hvor prøverne blev udtaget.

I kategorien "levende fugle" indgik kloaksvaberprøver fra 479 fugle. Ringmærkere fra Ringmærkningscentralen, Statens Naturhistoriske Museum, indsamlede kloaksvabere fra vildtlevende fugle på flere lokaliteter (figur 2). De "levende fugle" blev enten fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning, eller nedlagt ved jagt samme dag som prøverne blev taget.



Figur 2. Indsamlingssteder på postnr.-niveau for fugle i den aktive overvågning for aviær influenza 2015. Både nedskudssteder for fugle i kategorien "nedlagt fjervildt", hvorfra der blev udtaget prøver på vildthåndteringsvirksomheder, og indsamlingslokaliteter for kategorien "levende fugle", der dækker over prøver indsamlet af Statens Naturhistoriske Museum (SNM), er vist på kortet. Tallene ved markeringerne angiver antallet af pools fra denne lokation. Hvis intet tal er skrevet ved markeringen blev kun en enkelt pool undersøgt.

Der blev i alt undersøgt prøver fra 973 fugle fordelt på 16 arter og de fleste landsdele (tabel 2). 66 % af prøverne blev indsamlet i Jylland, og kun 10 % i Hovedstadsområdet. Dermed blev målet om at få inddraget flere prøver fra Jylland nået, og fordelingen af prøver var spredt mere ligeligt ud på forskellige landsdele.

Fordelt på artsgrupper var 74 % af prøverne fra ænder, 8 % fra svaner, 4 % fra måger, 13 % fra gæs og 1 % fra vadefugle. Gråænder udgjorde den største andel med 507 fugle, og udgjorde 52 % af de testede fugle. I forhold til 2014, var andelen af gæs steget fra 3 % til 13 %, så målet med at inkludere flere gæs blev nået. Artssammensætningen i øvrigt adskiller sig ikke markant.

Tabel 2. Prøver indsamlet af vildtlevende fugle i 2015 fordelt på arter og landsdele.

Art	Jylland	Fyn	Sjælland	Hovedstadsområdet	Sum
Blisgås	2		1		3
Bramgås	70		2		72
Dobbeltbekkasin	2				2
Gråand, levende fugle	74	4		3	81
Gråand, nedlagt fjervildt	272	90	100		462
Grågås, levende fugle	37	1	7		45
Grågås, nedlagt fjervildt	3				3
Hvinand	1				1
Hættemåge				13	13
Knopsvane		2	23	53	78
Krikand, levende fugle	62				62
Krikand, nedlagt	25				25
Pibeand	52		7		59
Skeand	1	1			2
Skovsneppe	8				8
Sneppefugl, nedlagt fjervildt	4				4
Spidsand	29				29
Stormmåge				8	8
Sølvmåge				16	16
Sum	642	98	140	93	973

Indsamlingen af prøver var koncentreret i efterårshalvåret, ud fra den erfaring at chancen for at finde fugleinfluenza er størst i denne periode. I 2015 blev der indsamlet prøver fra 44 fugle i 1. kvartal. De var alle negative for influenzavirus. Prøver fra de resterende fugle blev indsamlet i perioden 1. september – 12. december og fordelte sig med 392 fugle i 3. kvartal og 537 i 4. kvartal.

Der blev testet i alt 973 fugle fordelt i 264 prøver, heraf var 206 pools og 58 enkeltprøver (tabel 3).

Tabel 3. Oversigt over antal fugle i de testede prøver.

Antal fugle pr. pool	Antal pools testet		Antal fugle
	Levende fugle	Nedlagt fjervildt	
1	58	0	58
2	15	0	30
3	21	2	69
4	22	2	96
5	48	96	720
I alt	164	100	973

PCR resultater

Prøverne blev indledningsvist testet med PCR for influenza A virus. I alt var 72 pools positive svarende til 27 % af prøverne (tabel 4). De positive pools blev testet med PCR for om de var H5 eller H7 subtyper. Heraf blev 20 pools subtypet og patogenicitetsbestemt ved sekventering til LPAI H5 og én til LPAI H7. Antallet af

de positive pools fordelte sig ligeligt på kategorierne ”nedlagt fjervildt” og ”levende fugle”, men frekvensen af positive prøver var dobbelt så høj for nedlagt fjervildt som for levende fugle (tabel 4).

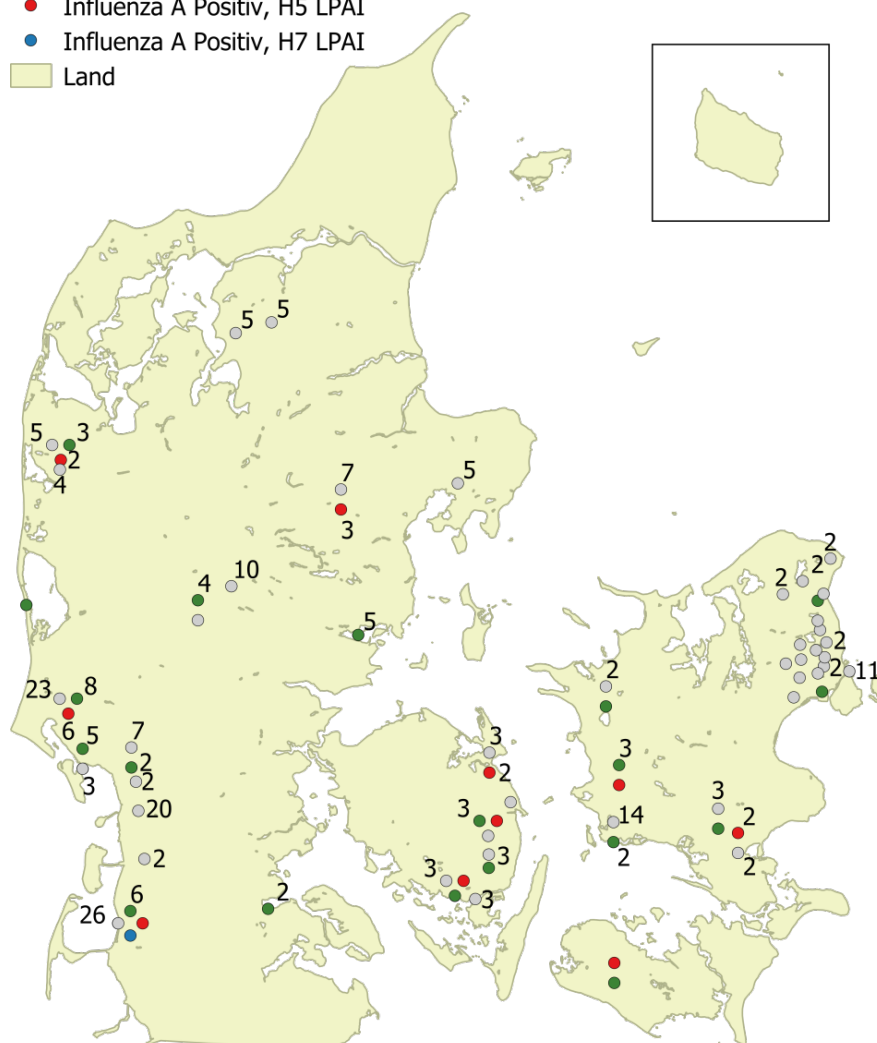
Tabel 4. PCR resultater for de testede prøver/pools fra den aktive overvågning af AI 2015.

	I alt	Nedlagt fjervildt	Levende fugle	Gråænder, (i % af hhv. AI PCR pos, H5 og H7 LPAI)
Antal pools	264	100	164	123 (47 %)
AI PCR positiv	72 (27 %)	40	32	44 (61 %)
H5 LPAI	20 (28 %)	13	7	13 (65 %)
H7 LPAI	1 (1 %)	0	1	0 (0 %)

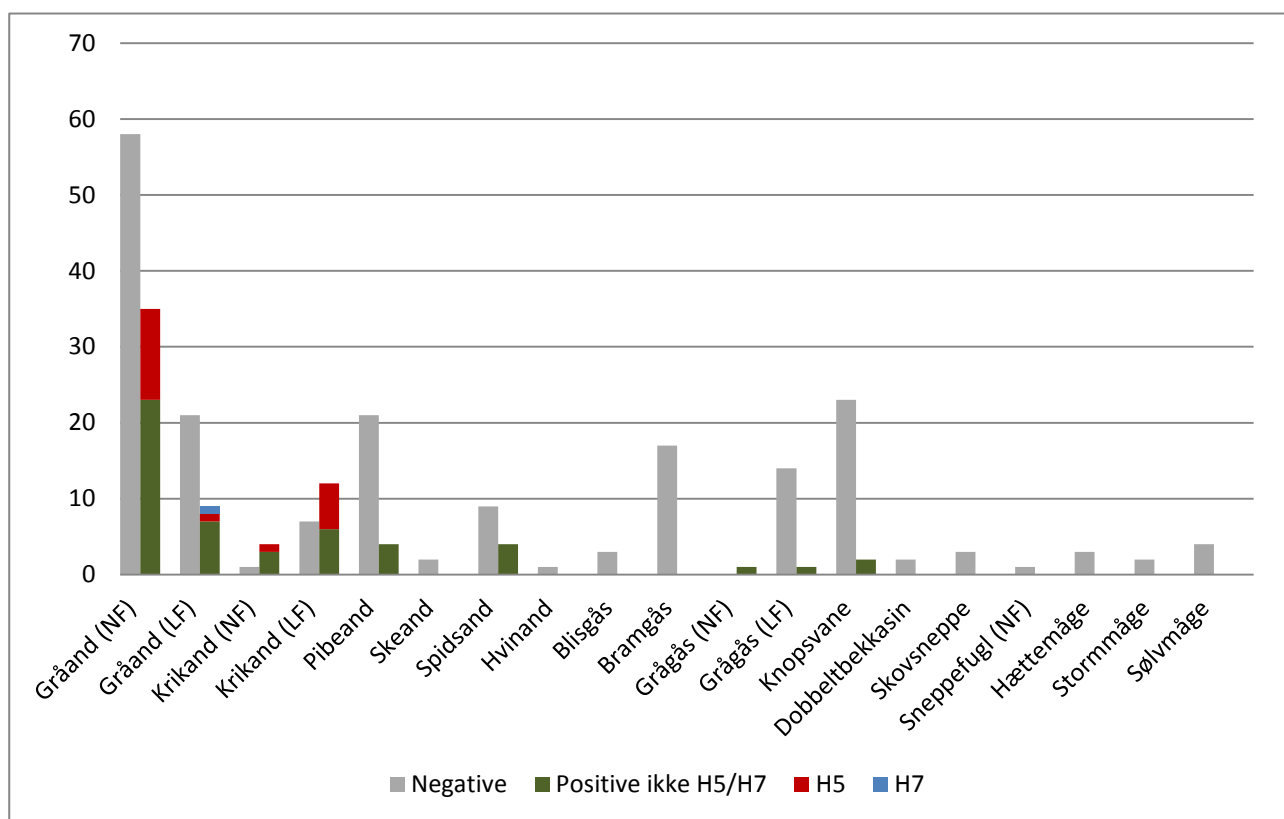
Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Lolland, Sjælland og herunder i Hovedstadsregionen. Der blev fundet influenzavirus i prøver fra alle indsamlingsområder. Flest positive prøver blev påvist i prøver fra Jylland (figur 3).

Tegnforklaring

- Influenza A Negativ
- Influenza A Positiv
- Influenza A Positiv, H5 LPAI
- Influenza A Positiv, H7 LPAI
- Land



Figur 3. Geografisk fordeling på postnr.-niveau af prøver indsamlet i den aktive overvågning af AI i Danmark 2015. Tallene ved markeringerne angiver antallet af pools fra denne lokation. Hvis intet tal er skrevet ved markeringen, blev kun en enkelt pool undersøgt.



Figur 4. Prøvefordelingen udspecificeret på fugleart. Diagrammet angiver antal prøver (pools) fordelt på fugleart og AI PCR-resultatet på primærmateriale inkl. H5/H7 subtypning. NF=nedlagt fjervildt, LF=levende fugle.

Der blev udtaget prøver i 1. kvartal og 3.-4. kvartal af 2015. Som nævnt var ingen af prøverne fra 1. kvartal positive for influenzavirus (bilag 2). Derimod var 27 % af prøverne fra 3. kvartal positive for influenzavirus, mens 30 % af prøverne fra 4. kvartal var positive. Af de i alt 72 prøver, der var positive for influenzavirus, svarende til 27 % af de testede prøver, var 68 pools fra svømmeænder (gråand, krikand, skeand, spidsand). De resterende 4 prøver var fra knopsvane (n=2) og grågås (n=2). Alle H5 og H7 positive prøver var fra gråænder eller krikænder (figur 4).

AI virus blev hovedsagligt påvist i prøver fra gråand, krikand, pipeand og spidsand (figur 4). Resultatet er i overensstemmelse med både europæiske (Munster et al. 2007) og danske overvågningsresultater fra både tidligere år (Hjulsager et al. 2012a,b) samt den generelle anerkendte opfattelse af andefugles (primært svømmefugles) rolle som de primære bærere af AI virus (Munster et al. 2007).

I lighed med 2014 er der udført subtypning af AI virus på primærmaterialet i udvalgte prøver ved fuldlængde sekventering af HA og NA generne. Tidligere blev der kun screenet for H5/H7 på primærmaterialet og subtypet på virusisolater, men da det kun er ca. 10 % af prøverne der typisk kan isoleres virus fra i æg (virusisolater), vil der være mange AI virus positive prøver, hvorom man ikke vil vide andet end om de er H5/H7 eller ej. Ti af de 11 AI virusisolater og 25 prøver fra primærmaterialet blevet analyseret ved sekvensanalyse. Dette gav yderligere information end den traditionelle H5/H7 og subtypning af isolater på subtypeniveau, og en detaljeret karakterisering af virus på strain niveau. Følgende subtyper blev påvist: H1, H1N1, H3, H3N8, H5, H5N3, H6, H6N2, H6N8, H7, H8N2, H8N4, H8N5, H9, H12. Alle var som forventet euroasiatisk lineage virus. En nærmere karakterisering af H5 og H7 virus er beskrevet nedenfor.

Virusisolater

Hæmagglutinerende virus (virusisolater) kunne isoleres efter podning i embryonerede hønseæg fra 19 prøver fra vilde fugle. Elleve af isolaterne var AI virus, fem var paramyxovirus (PMV) og om de 3 sidste vides at de ikke var AI og heller ikke PMV1 (bilag 3).

Aviær influenza

Ved subtypning af AI virusisolaterne blev der fundet virus med følgende subtyper: H1N1 (n=2), H3N8 (n=1), H5N2 (n=1), H6N2(n=4), H6N8 (n=1) og H10N1(n=1) (Bilag 3). Et isolat blev ikke subtypet yderligere end at det ikke var H5/H7. Alle isolaterne var fra svømmeænder, og subtypekombinationerne er før fundet i Danmark (Hjulsager et al. 2012b). Succesraten for isolation af AI virus var en smule lavere men stadig på niveau med de foregående år.

Paramyxovirus

Overvågningen var ikke rettet mod påvisning af paramyxovirus (PMV), og der blev derfor ikke foretaget screening af alle prøver for PMV. Både AI virus og PMV er imidlertid hæmagglutinerende virus, så virusisolater, der ikke kan subtypes som AI virus, testes rutinemæssigt for PMV1, og i de fleste tilfælde også for de øvrige PMV typer. Således blev 3 virusisolater, der ikke var AI virus, kun testet for om de var PMV1 med PCR. Disse er markeret med "*" i bilag 3.

Der blev påvist et PMV1 virus og fire PMV6 virus. Disse typer er blandt de hyppigst påviste i de foregående år. Alle PMV virusisolaterne var fra svømmeænder (gråand, krikand, pibeand). Dette tyder på at svømmeænderne ofte er inficeret med paramyxovirus, og ænder betragtes da også som naturlig vært for de fundne PMV typer (Alexander, 2000b). Da andefugle både betragtes som naturlig vært for AI og PMV virus, er fundet af PMV i AI overvågningsprøverne ikke overraskende.

Prøver indeholdende flere virus

Subtypning af virus afslørede tilstedeværelsen af mere end et AI virus med forskellige subtyper i nogle prøver. Fx var der 2 prøver hvorfra der blev isoleret H6N2 virus i æg, men påvist H5 LPAI med PCR og sekventering på primærmaterialet (bilag 3). Den aktive overvågning i vilde fugle er siden 2011 udført på poolerede prøver, hvilket kan være en del af forklaringen på at der kan påvises flere virus i samme prøve. Men det er et naturligt forekommende fænomen, at fugle kan være inficeret med flere forskellige virus på samme tid. Dette danner basis for dannelsen af virus reassortments, som er en udbredt mekanisme til evolution af AI virus, hvor nye AI virus dannes ved at gener fra forskellige virus blandes, når den samme celle er inficeret med forskellige virus.

Sammenligning med resultater fra tidligere år

Nøgletallene fra den aktive overvågning af AI i 2012-15 er angivet i tabel 5. Det var et krav at prøver der indgik i overvågningen blev modtaget indenfor 5 dage efter udtagelse. Målet på 1000 fugle blev næsten nået, og andelen og antallet af positive prøver i 2015 var på niveau med de foregående år. Andelen af H5 positive var på niveau med 2012-13, efter et fald af ukendt årsag i 2014. Det betød, at vi igen kunne udføre en kvalificeret vurdering af H5 diversiteten i danske vilde fugle. Andelen af prøver, hvorfra der kunne isoleres virus, var på niveau med tidligere år.

Fuglearten synes at være den afgørende faktor for indsamling af en af AI virus positive prøver. Forskelle i indsamlingsstrategierne og deraf følgende håndtering af prøverne undervejs til laboratoriet synes af mindre betydning i denne sammenhæng. De anvendte indsamlingsmetoder har suppleret hinanden, således at overvågningen har indbefattet flere forskellige arter, samtidig med at der blev påvist relativt mange AI virus positive prøver.

Tabel 5. Sammenligning af AI overvågning 2012-15 i vilde fugle – aktiv overvågning. PCR screeningsresultater på primærmateriale.

	2012		2013		2014		2015	
	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]
Nedlagt fjervildt*	600	120	500	103	499	101	494	100
Levende fugle**	614	185	498	160	513	185	479	164
I alt	1214	305	998	263	1012	286	973	264
PCR positive	-	96 (31 %)	-	56 (21 %)	-	50 (17 %)	-	72 (27 %)
H5 LPAI	-	27 (28 %)	-	16 (29 %)	-	5 (10 %)	-	20 (28 %)
H7 LPAI	-	2 (2 %)	-	0	-	3 (6 %)	-	1 (1 %)
H5+H7 LPAI	-	1 (1 %)	-	1 (2 %)	-	0	-	0
AI VI positive	-	12 (13 %)	-	14 (25 %)	-	13 (26 %)	-	11 (15 %)

[#] Prøver er pools af 1-5 kloaksvabere udtaget fra samme art, på samme sted (postnr.) og tid. *Prøver fra nedlagt fjervildt er indsamlet på vildthåndteringsvirksomheder. **Prøver fra Levende fugle er indsamlet via SNM og enten levende fugle genudsat efter prøveudtagelse eller nedlagt ved jagt og samlet samme dag.

Molekylær karakterisering af AI virus fra vilde fugle

H5 evaluering af diagnostiske assays

Der blev påvist LPAI H5 virus i 20 pools i den aktive overvågning i vilde fugle i 2015. De var alle fra prøver fra gråænder eller krikænder (figur 4, bilag 2).

Der blev udført HA sekventering på 15 af de 20 prøver. Prøven hvorfra der kunne isoleres H5N3 i æg, blev sekventeret både på virusisolatet og primærmaterialet inden opformering i æg. Sekvenser fra alle 15 prøver indgik i en assay fitness analyse (bilag 4), hvor de diagnostiske assays blev evalueret. Til subtypning og patogenicitetsbestemmelse af H5 virus anvendes de EU anbefalede specifikke RT-PCR assays (Slomka et al. 2007a; Slomka et al. 2007b; Slomka et al. 2012) rutinemæssigt til AI diagnostik og overvågning på DTU-VET. Primer- og probesekvenserne for de tre H5 specifikke RT-PCR assays blev sammenlignet med de 16 H5 virussekvenser fra 2015, samt 2 sekvenser fra 2014 og 4 fra 2012 (bilag 4). Sekvenserne fra 2012 er tidligere identificeret som særligt problematiske i forhold til detektion med det ene H5 real-time assay pga mutationer, der var tilstede i flere H5 virus som gav mis-match til primer/probe (Hjulsager 2013). Analysen af sekvenser fra 2015 indikerer, at den variant af H5 virus ikke er særlig prævalent mere.

Analysen indikerer, at de assays, der anvendes til subtypning af H5, er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, på trods af den drift i sekvenserne, som blev afsløret af de fylogenetiske analyser (se nedenfor). Da de danske virus jo i første omgang er fanget af disse assay, er der naturligvis en bias i resultatet. Der er dog ikke fundet yderligere H5 virus ved subtypning af isolater og primærprøver, der ikke i første omgang var subtypet som H5, med H5 specifikke assays. Det er også vigtigt at supplere med bevågenhed overfor fremkomst af nye virus i omkringliggende lande og resten af verden, særligt Euroasien, som de danske virusgener oftest udveksles med. Det kan være umuligt at designe et enkelt assay bestående af to primere og en probe, som sensitivt kan detektere alle varianter af H5. Det er derfor relevant at anvende flere assays i rutinediagnostikken for at opnå en bedre sensitivitet, ligesom det gøres i dag på DTU-VET. Analysen understreger endvidere vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov.

H5 diversitet

Der er udført fylogenetisk analyse af 16 H5 sekvenser fra 2015 (fra 15 prøver hvoraf den ene både blev sekventeret på primærmateriale og på virusisolat) ved sammenligning med danske sekvenser fra tidligere år (figur 5). Seks sekvenser var dog lidt for korte til at komme med i det fylogenetiske træ i figur 5, men

supplerende fylogenetiske analyser (ikke vist) viste, at disse fem sekvenser grupperede sig sammen med de øvrige sekvenser fra prøver fra 2015.



Figur 5. Fylogenetisk analyse af danske fuldlængde LPAI H5 gener fra vilde fugle og fjerkræ. Sekvenser fra H5 virus fra vilde fugle i Danmark 2015 er med rød tekst. HP angiver højtpatogen AI. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ.

Den fylogenetiske analyse viser, at H5 generne fra prøverne fra 2015 er nært beslægtede med H5 gener fra virus i prøver fra vilde fugle, der blev indsamlet i Danmark i 2012 (figur 5). De er ikke beslægtet med H5N8 HPAI fundet i Europa i 2014. Analysen afslører en betydelig genetisk drift. Ved at sammenholde gruppering i det fylogenetiske træ med prøveudtagelses tid og sted (postnr. og udtagelsesmåned fremgår af virusnavnene i træet) ses det at der alene er sammenhæng mellem gruppering og udtagelsesår. Ved karakterisering af 19 virus fra 2012 (Hjulsager et al. 2013) var konklusionen den samme. Analyserne er i overensstemmelse med den udbredte antagelse, at der cirkulerer forskellige grupper af virus blandt vilde fugle, og at der sker udveksling af gener mellem virus.

Der er gennem de senere års overvågninger af AI i vilde fugle påvist H5 LPAI virus i relativt mange prøver, men der har ikke været udbrud i fjerkræ med LPAI H5 virus udover et udbrud i 2003 og tre udbrud i 2006 (virusnavnene er markeret med "c" i figur 5), alle i gråandebesætninger (Hjulsager et al. 2012b). Den fylogenetisk analyse viste, at udbrud i kommercielle fjerkræflokke skyldes virus, der har stor lighed med cirkulerende virus i vilde fugle, hvilket tyder på at smitten sker fra vilde fugle til tamfjerkræ og understreger vigtigheden af adskillelse af de to populationer.

H7 diversitet

Der blev fundet LPAI H7 i én pool af prøver fra 5 gråender i den aktive overvågning i vilde fugle i 2015. Prøverne blev indsamlet af SNM i Sønderjylland. Virus blev karakteriseret som LPAI med kløvningssite sekvensen PEIPKGRGLF, som er den sekvens, der oftest findes i H7 LPAI. Det var ikke muligt at sekventere hele H7 genet, men baseret på sekvensen omkring kløvningssitet er virus ikke tæt beslægtet med H7N9-China-like virus. Denne variant af H7N9 virus er endnu ikke påvist i Europa.

LPAI H7 virus påvises med meget lavere frekvens end H5 LPAI virus i vilde fugle i Danmark. Ikke desto mindre er det netop H7 LPAI virus, der har givet anledning til udbrud i fjerkræ de senere år, senest i 2013 og før det i 2010 og 2008. Kilden til disse udbrud kan være vilde fugle, idet de virus, der blev fundet i fjerkræ, var nært beslægtede med virus fra vilde fugle i Danmark.

H9 virus

Der er en stigende bevågenhed overfor AI virus med H9 subtypen, da denne subtype har opnået enzootisk udbredelse i flere dele af verden, herunder Kina og Mellemøsten, og også optræder i Europa. Der er ligeledes rapporter om, at H9N2 virus kan være mere patogene i fjerkræ end andre LPAI, og så har de også vist zoonotisk potentiale både ved smitte af H9N2 virus til mennesker, men især fordi H9N2 virus også menes at have doneret en del af generne til de humane patogene LPAI H7N9 virus samt til HPAI H5N8.

Alle AI virusisolater fra overvågningen i vilde fugle 2015 er testet for H9 subtypen med et real-time RT-PCR assay, som specifikt kan detektere HA genet i AI virus med H9 subtypen. Ingen AI virus isolater var H9 subtype (bilag 3).

De danske H9N2 virus, der blev påvist i sidste års overvågning, lignede mest dem, der er fundet i vilde fugle i Skandinavien og landene omkring os. Indtil 2014 er der fundet H9N2 virus ved virusisolation og klassisk typning med HI-test i en gråand fra 2012, denne er også tæt beslægtet med virus fra 2014. Derudover er der fundet H9N1 i en gråand i 2005, som mere ligner de samtidige europæiske virus på HA genet.

Tørsvabervalidering

Som supplement til overvågningen gennemførtes i 2014 og 2015 en indsamling af tørsvabere parallelt med almindelige "våde" svabere udtaget i kloakmedie. I begge tilfælde anvendtes sterile vatpinde med træskaft. Formålet var at indsamle prøver som kunne bruges til validering af anvendelsen af tørsvabere, hvor man

undgår anvendelse af AI medie i felten. AI mediet produceres på DTU-VET og har en begrænset holdbarhed på 6 måneder og skal opbevares nedfrosset fra produktion til anvendelse. Dette betyder, at både distribution og opbevaring af mediet skal være på frost og komplicerer anvendelsen.

I 2014 blev de tørre svabere udtaget fra 100 fugle på vildthåndteringsvirksomheden Kivan Food, således at der fra samme fugl først blev udtaget en almindelig svaber i kloakmedie, og dernæst en tørsvaber. Den tørre svaber blev udtaget ligesom svaberen i kloakmedie ved at føre svaberen ind i kloakken, så vatknoppen blev dækket, hvorefter den blev drejet rundt et par gange. Kloaksvaberen skulle helst være dækket af fæces (optimalt 1 gram). Svaberen kunne evt. vædes med fysiologisk saltvand inden svabring. I praksis, var det som regel ikke nødvendigt, da kloakmedie fra den foregående udtagelse af en våd svaber efterlod kloakken tilstrækkelig fugtig. Svaberprøven blev placeret i et tomt prøverør, og mærket på samme måde som den tilsvarende våde svaber. Rørene blev opbevaret på køl indtil og under forsendelse til laboratoriet, ligesom svabere udtaget i kloakmedie. Ved ankomst til laboratoriet, blev de tørre svabere tilsat 3 ml kloakmedie, dvs. samme mængde som i de alm. svaberrør. Prøverne blev efterfølgende poollet med op til 5 prøver af dyr af samme art udtaget på samme sted og tid, og behandlet på samme måde som de våde almindelige svabere.

I 2015 blev de tørre svabere udtaget inden der blev udtaget almindelige våde svabere i kloakmedie fra de samme fugle. Alle øvrige forhold var som beskrevet for tørsvabere 2014.

Analyse af tørsvaberne er ikke en del af budgettet for overvågningen, men afrapporteres her. Både i 2014 og 2015 blev de 100 prøver blev udtaget over 2 gange. De blev begge år poollet til 20 prøver, hvoraf hhv. 5 og 8 var positive for AI virus (tabel 6). Af tørsvaberprøverne der var udtaget efter en parallel vådsvaber (2014), var en pool positiv for H5 og en anden for H7. Begge kunne bekræftes og patogenicitetsbestemmes ved sekvensanalyse som LPAI. For tørsvabere der var udtaget inden parallel vådsvabere (2015) var 3 pools positive for LPAI H5 på både tør- og vådsvabere. Kvaliteten af sekvenserne for tørsvaberne var dog ikke særligt gode, hvilket meget vel kunne hænge sammen med et lavere udbytte af virus i tørsvaberprøverne, som vurderet ud fra højere Ct-værdier i forhold til de parallelle våde svaberpools. Derfor lavede vi nye pools af tørsvabere "T2" for det sidste hold tørsvabere fra 2015, efter tørsvaberne havde stået i medie yderligere 6 dage. I to tilfælde opnåede vi bedre udbytte (lavere Ct-værdi) for T2 end T på pan-AI PCR'en; for H5 assays var det ikke bedre.

I forhold virusisolations succes, kunne der i et tilfælde ikke isoleres AI virus fra tørsvaberen, selvom virusisolation fra den tilsvarende våde svaber var succesfuld (14-9959-27). I et andet tilfælde kunne PMV isoleres fra tørsvabere men ikke fra den parallelle våde svaber (14-12224-26T,); for et andet sæt parallelle prøver var det omvendt (15-21256-22). Succesen for at isolere virus i æg er afhængig af tilstedeværelsen af intakte viruspartikler, og i praksis er der en sammenhæng med hvor positiv prøven er, således at det er nemmere at dyrke fra en stærkt positiv prøve, måske fordi sandsynligheden for at der er nogle intakte viruspartikler så er større. Angående tørsvaberne kan det samme gøre sig gældende, dog kan udtørring også have haft en negativ indflydelse på virusisolations succes.

Konklusionen ud fra PCR resultaterne var nogenlunde enslydende uanset om analyserne køres på tørsvaber eller almindelig våd svaber. Men tørsvaberne var 1-5 Ct-værdier højere end deres parallelle våde svabers Ct-værdi, hvilket kan betyde en lavere sensitivitet for den enkelte prøve.

Datamængden er ikke tilstrækkelig til at drage en endelig konklusion ang. anvendeligheden af tørsvabere til prøveudtagelse, men på baggrund af de opnåede resultater kan det ikke anbefales pt. Det faktum at tørsvaberne er svagere positive end deres vådsvaber pendant, synes ikke umiddelbart at være af en rent

mekanisk årsag, da tørsvabere generelt var dårligere uanset om de blev taget før eller efter de våde svabere. Det tyder derimod på at virus nedbrydes på den tørre svaber.

På baggrund af den udførte validering af tørsvabere, kan det ikke anbefales at disse anvendes, da sensitiviteten nedsættes betragteligt.

Tabel 6. PCR resultater på tørsvaberprøver sammenlignet med de parallelle almindelige våde svabere.

Prøve	Pan-AI PCR Ct	H5 PCR Ct	H7 PCR Ct	CS sekvens	VI
14-9959-27	33	0	31	H7 LPAI	H7N3 (2.pas)
14-9959-27T	35	0	35	H7 LPAI	0
14-9960-26	29	0	0	-	0
14-9960-26T	34	0	0	-	0
14-9960-29	34	0	0	-	PMV (2.pas)
14-9960-29T	37	0	0	-	0
14-12224-26	31	0	0	-	0
14-12224-26T	33	0	0	-	PMV-6 (1.pas)
14-12224-27	31	31/31	0	H5 LPAI	0
14-12224-27T	32	33/34	0	H5 LPAI	0
15-16917-51	30	0	0	-	0
15-16917-51T	32	0	0	-	0
15-16917-55	30	0	0	-	0
15-16917-55T	33	0	0	-	0
15-16917-59	29	36/30	0	H5 LPAI	PMV6 (2.pas)
15-16917-59T	33	0/34	0	H5 LPAI	Ikke AI/ikke PMV1
15-21255-11	31	33/31	0	H5 LPAI	Ikke AI/ikke PMV1
15-21255-11T	33	35/32	0	H5 LPAI	Ikke AI/ikke PMV1
15-21255-11T2	33	35/34	0	H5 LPAI	-
15-21256-21	31	0	0	-	0
15-21256-21T	33	0	0	-	0
15-21256-21T2	30	0	0	-	-
15-21256-22	33	0	0	-	Ikke AI/ikke PMV1
15-21256-22T	34	0	0	-	0
15-21256-22T2	32	0	0	-	-
15-21256-23	32	35/33	0	H5 LPAI	0
15-21256-23T	35	0/38	0	-	0
15-21256-23T2	35	0/38	0	H5 LPAI	-
15-21256-24	35	0	0	-	0
15-21256-24T	35	0	0	-	0
15-21256-24T2	33	0/38	0	-	-

Prøver der er navngivet 14-xxx er udtaget i 2014 (tørsvabere efter vådsvabere) mens prøver der er navngivet 15-xxx er udtaget i 2015 (tørsvabere inden vådsvabere). T-suffiks angiver tørsvaberprøver. T2-suffiks angiver tørsvabere der har stået i kloakmedie i yderligere 6 dage. Der er testet med 2 H5 real-time assays, hhv. H5HA2 og H5CS (Slomka et al. 2012). Ct=cycle threshold værdi, en positiv prøve har en Ct-værdi, og jo lavere den er, jo mere positiv er prøven. Ct=0 for en negativ prøve. CS sekvens=patogenicitet baseret på sekvens i kløvningssitet. VI=virusisolation i æg med angivelse af passage (pas) nr. "Ikke AI/ikke PMV1" angiver hæmagglutinerende virus der ikke er AI og ikke PMV1 og ikke testet for andre PMV typer.

Molekylær karakterisering af AI virus fra fjerkræ

Der har ikke været udbrud af AI virus med H5 eller H7 subtype virus i danske fjerkræbesætninger i 2015, men der er påvist virus med anden subtype i to indsendelser fra besætninger med opdræt af gråender. Disse blev påvist i forbindelse med den rutinemæssige overvågning af opdrættet fjervildt, hvor der i 2015 blev undersøgt 256 indsendelser. Typisk blev der undersøgt 3 indsendelser fra hver besætning fordelt over perioden maj-september. Hver indsendelse blev undersøgt for AI virus med PCR på en pool af kloaksvabere og på en pool af trachealsvabere fra 10 kadavere indsendt til DTU-VET. Formålet var at påvise LPAI H5/H7 virus, for at undgå udslip til den vilde fauna og at disse skal udvikle sig til HPAI. Derfor undersøges i første omgang kun, om der kan påvises AI virus i prøverne, og om dette i så fald er H5/H7 subtype. Resultatet af en eventuel yderligere subtypning fremgik ikke af de udsendte laboratoriesvar, men afrapporteres her.

Tabel 7. AI virus positive indsendelser fra fjerkræbesætninger i 2015.

Besætnings-ID	Indsendelse	Udtagelsesdato	Fugleart	Besætningstype	virus	AI positiv prøve
A	15-10813	25-06-2015	Gråand	Opdræt af fjervildt	H10N7	K+S
B	15-11339	15-07-2015	Gråand	Opdræt af fjervildt	H10N7	K+S

K=kloaksvaber; S=trachealsvaber (der er undersøgt både K og S fra hver indsendelse).

Der blev påvist H10N7 virus i 2 indsendelser fra to forskellige besætninger (tabel 7). Begge viruspåvisninger var i gråænder, selvom gråænder kun udgør en mindre del af indsendelserne, som domineres af fasanhold. I 2015 var der 10 indsendelser af agerhøns, 30 af gråænder og 216 af fasaner. Fund af virus i gråandeindsendelser er i overensstemmelse med at gråænder anses for at være meget modtagelige for AI virus. Der blev også påvist AI virus i begge besætninger i 2014, ligesom der er påvist virus i foregående år. Gentagne fund af virus, og nogle gange det samme virus over længere tid, viser, at LPAI virus kan cirkulere i en længere periode i en besætning, formodentlig fordi LPAI virus spredes langsomt og/eller persisterer i længere tid i den enkelte and. Endelig indikerer de gentagne AI virus positive indsendelser fra kun en lille del af de indsendende besætninger, at der er en øget risiko for introduktion af virus i nogle besætninger. Ser man på de foregående års overvågning af fjervildtopdræt (tabel 8), så er der relativt få AI virus positive indsendelser. Det er derfor særligt påfaldende, at disse begrænser sig til nogle få gengangere blandt de indsendende besætninger, som går igen over årene. Hvis der er en øget tendens til introduktion af AI virus, som ikke er H5/H7, kan denne ekstrapoleres til også at indikere en øget risiko for introduktion af H5/H7 virus. Besætning "A" har således haft udbrud af både H5 og H7 LPAI virus i hhv. 2003 og 2013. Det er almindeligt anerkendt, at AI virus kan introduceres ved kontakt med vilde fugle, enten direkte hvilket er sandsynligt ved opdræt af fjervildt, som har adgang til det fri, eller indirekte ved kontakt med forurenede genstande.

Karakterisering af virus fra gentagne indsendelser af opdrættet fjervildt har understreget nødvendigheden af en løbende test af gråandebesætninger, da virus kan persistere i længere tid i besætningerne, hvilken er en velkendt risikofaktor for udvikling af HPAI fra LPAI med subtyperne H5 og H7.

Tabel 8. Oversigt over antal indsendelser til den virologiske overvågning af opdrættet fjervildt i perioden 2006-2015. Modificeret fra Hjulsager et al. 2012b.

Indsendelser	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Antal	ca. 250	395	362	333	307	258	272	267	255	256
AI virus positive	7	2	4	7	0	4	0	3	6	2
AI H5/H7 positive	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Referencer

- Alexander, D.J., 2007. An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza. *Vaccine* 25, 5637-5644.
- Alexander, D.J., 2000a. A Review of Avian Influenza in Different Bird Species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13.
- Alexander, D.J., 2000b. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 19 (2), 443-462.
- Banks, J., Speidel, E.S., Moore, E., Plowright, L., Piccirillo, A., Capua, I., Cordioli, P., Fioretti, A., Alexander, D.J., 2001. Changes in the Haemagglutinin and the Neuraminidase Genes Prior to the Emergence of Highly Pathogenic H7N1 Avian Influenza Viruses in Italy. *Arch. Virol.* 146, 963-973.
- Capua, I., Alexander, D.J., 2007. Animal and Human Health Implications of Avian Influenza Infections. *Biosci. Rep.* 27, 359-372.
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Capua, I., 2009. H5N1 Virus Evolution in Europe—An Updated Overview. *Viruses* 2009, 1, 1351-1363. *Viruses* 1, 1351-1363.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelswaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
- Fuller, C.M., Collins, M.S., Alexander, D.J., 2009. Development of a real-time reverse-transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle disease virus isolates using a novel probe. *Arch. Virol.* 154, 929-937.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y., 2001. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science* 293, 1840-1842.
- Hjulsager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Handberg, K.J., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Baroch, J.A., DeLiberto, T.J., Larsen, L.E., Jørgensen, P.H., 2012a. Surveillance for Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Denmark and Greenland, 2007-10. *Avian Dis.* 56, 992-998.
- Hjulsager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., 2012b. Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2003-2011. Rapport, 2.udgave pr. 10, juni 2014.
- Hjulsager, C.K., Krog, J.S., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., 2013. Molekylær karakterisering af influenzavirus fra vilde fugle i Danmark i 2012. Rapport, 31.12.2013..
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all nfluenza A viruses. *Arch. Virology* 146, 2275-2289.
- Keawcharoen, J., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W.E., van Lavieren, R., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., Kuiken, T., 2008. Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 14, 600-607.
- Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenstrom, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A., Fouchier, R., 2007. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLoS Pathog* 3, 630-638.
- Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2009. Avian Influenza Virus: Of Virus and Bird Ecology. *Vaccine* 27, 6340-6344.
- Slomka, M.J., Coward, V.J., Banks, J., Löndt, B.Z., Brown, I.H., Voermans, J., Koch, G., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., Cherbonnel-Pansart, M., Jestin, V., Cattoli, G., Capua, I., Ejdersund, A., Thorén, P., Czifra, G., 2007a. Identification of Sensitive and Specific Avian Influenza Polymerase Chain Reaction Methods Through Blind Ring Trials Organized in the European Union. *Avian Dis.* 51, 227-234.
- Slomka, M.J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S., Brown, I.H., 2007b. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis.* 51, 373-377.

- Slomka, M.J., To, T.L., Tong, H.H., Coward, V.J., Hanna, A., Shell, W., Pavlidis, T., Densham, A.L.E., Kargiolakis, G., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2012. Challenges for accurate and prompt molecular diagnosis of clades of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses emerging in Vietnam. *Avian Pathol.* 41, 177-193.
- Slomka, M.J., Hanna, A., Mahmooda, S., Govil, J., Krill, D., Manvell, R.J., Shell, W., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2013. Phylogenetic and molecular characteristics of Eurasian H9 avian influenza viruses and their detection by two different H9-specific RealTime reverse transcriptase polymerase chain reaction tests. *Vet.Microbiol.* 162,530-542.
- Stech, O., Veits, J., Weber, S., Deckers, D., Schröder, D., Vahlenkamp, T.W., Breithaupt, A., Teifke, J., Mettenleiter, T.C., Stech, J., 2009. Acquisition of a Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site by a Low-Pathogenic Avian Influenza Virus is Not Sufficient for Immediate Transformation into a Highly Pathogenic Strain. *J. Virol.* 83, 5864-5868.
- Verhagen, J.H., Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2011. 28 - Ecology and Evolution of Avian Influenza Viruses. *Genetics and Evolution of Infectious Disease*. Elsevier, London, pp. 729-749.

Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning

AI 2015 – passiv overvågning

Kategori	Tilstand	Art	Latin	VET sagsnr.	Kommune	Indsamlings- dato	Resultat
Faldvildt	Død	Sortand	Melanitta nigra	15-21797-07	Varde	16-11-2015	Negativ
FVR	Død	Gråand	Anas platyrhynchos	15-19494-01	København	22-10-2015	Negativ
FVR	Død	Gråand	Anas platyrhynchos	15-19494-03	København	22-10-2015	Negativ
FVR	Død	Gråand	Anas platyrhynchos	15-19494-02	København	22-10-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Musvåge	Buteo buteo	15-19484-01	Vordingborg	21-10-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Moskusand	Cairina moschata	15-18620-01	Hørsholm	08-10-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Gråand	Anas platyrhynchos	15-13954-01	Guldborgsund	16-08-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Gråand	Anas platyrhynchos	15-13954-02	Guldborgsund	16-08-2015	Ikke H5/H7
FVR	Død	Grågåse	Anser anser	15-12245-02	Tårnby	19-07-2015	Negativ
FVR	Død	Grågåse	Anser anser	15-12245-03	Tårnby	19-07-2015	Negativ
FVR	Død	Grågåse	Anser anser	15-12245-01	Tårnby	19-07-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Sølvmåge	Larus argentatus	15-11221-01	Skanderborg	01-07-2015	Negativ
FVR	Død	Gråand	Anas platyrhynchos	15-07265-01	København	29-04-2015	Negativ
FVR	Død	Knopsvane	Cygnus olor	15-07173-02	Tårnby	28-04-2015	Negativ
FVR	Død	Knopsvane	Cygnus olor	15-07173-01	Tårnby	28-04-2015	Negativ
FVR	Død	Spurvehøg	Accipiter nisus	15-04819-01	København	26-03-2015	Negativ
FVR	Død	Husskade	Pica pica	15-04993-01	Glostrup	23-03-2015	Negativ
FVR	Død	Musvåge	Buteo buteo	15-04994-02	Frederikssund	17-03-2015	Negativ
FVR	Død	Musvåge	Buteo buteo	15-04994-01	Frederikssund	17-03-2015	Negativ
FVR	Død	Knopsvane	Cygnus olor	15-04057-01	København	07-03-2015	Negativ
FVR	Død	Sølvmåge	Larus argentatus	15-03486-06	Fanø	18-02-2015	Negativ
FVR	Død	Sølvmåge	Larus argentatus	15-03486-01	Fanø	18-02-2015	Negativ
FVR	Død	Sølvmåge	Larus argentatus	15-03486-02	Fanø	18-02-2015	Negativ
FVR	Død	Sølvmåge	Larus argentatus	15-03486-03	Fanø	18-02-2015	Negativ
FVR	Død	Sølvmåge	Larus argentatus	15-03486-04	Fanø	18-02-2015	Negativ
FVR	Død	Sølvmåge	Larus argentatus	15-03486-05	Fanø	18-02-2015	Negativ
FVR	Død	Strandskade	Haematopus ostralegus	15-03486-07	Fanø	18-02-2015	Negativ
FVR	Død	Sangsvane	Cygnus cygnus	15-02668-01	Kolding	10-02-2015	Negativ
FVR	Død	måge	måge	15-02668-03	Kolding	10-02-2015	Negativ
FVR	Død	Knopsvane	Cygnus olor	15-02668-02	Kolding	10-02-2015	Negativ
FVR	Død	Sangsvane	Cygnus cygnus	15-00438-01	Syddjurs	06-02-2015	Negativ
FVR	Død	Knopsvane	Cygnus olor	15-00478-01	København	20-01-2015	Negativ
FVR	Død	Sangsvane	Cygnus cygnus	15-00465-01	Esbjerg	14-01-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Sangsvane	Cygnus cygnus	15-00440-01	Billund	06-01-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Sangsvane	Cygnus cygnus	15-00439-01	Billund	06-01-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Sangsvane	Cygnus cygnus	15-00442-01	Billund	06-01-2015	Negativ
Faldvildt	Død	Sangsvane	Cygnus cygnus	15-00441-01	Billund	06-01-2015	Negativ

Faldvildt: indsendt af borgere eller Veterinærenhed, der foretages undersøgelser udover AI i regi af Center for Vildtsundhed.

FVR: mistanke om AI indsendt/visiteret af Veterinærenhederne.

Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning

AI 2015 – aktiv overvågning

Kvartal	Lokalitet	Fangst metode	Dyreart	Antal pools	Antal fugle	AI virus positive prøver	H5 LPAI positive prøver	H7 LPAI positive prøver	Subtype på primær-materiale	AI virus isolater
1	KBH	Levende	gråand	1	3	0	0	0		
1	KBH	Levende	hættemåge	3	13	0	0	0		
1	KBH	Levende	knopsvane	1	4	0	0	0		
1	KBH	Levende	stormmåge	2	8	0	0	0		
1	KBH	Levende	sølvmåge	4	16	0	0	0		
3	Fyn	Levende	gråand	1	2	1	0	0		
3	Fyn	Levende	skeand	1	1	0	0	0		
3	Jylland	Levende	bramgås	1	1	0	0	0		
3	Jylland	Levende	dobbeltbekka sin	1	1	0	0	0		
3	Jylland	Levende	gråand	15	50	7	1	1	H1, H5, H7	H10N1
3	Jylland	Levende	grågås	10	37	1	0	0		
3	Jylland	Levende	krikand	12	42	8	4	0	H5N3, H5	H5N3, H6N8
3	Jylland	Levende	pibeand	8	15	0	0	0		
3	Jylland	Levende	skeand	1	1	0				
3	Jylland	Levende	spidsand	8	20	3	0	0		H6N2
3	Jylland	Nedlagt	gråand	20	100	3	3	0	H5x3	
3	KBH	Levende	knopsvane	16	49	2	0	0	H3	H1N1
3	Sjælland	Levende	knopsvane	7	23	0				
3	Sjælland	Nedlagt	gråand	10	50	5	2	0	H5x2, H6	
4	Fyn	Levende	gråand	1	2	0				
4	Fyn	Levende	grågås	1	1	0				
4	Fyn	Levende	knopsvane	1	2	0				
4	Fyn	Nedlagt	gråand	18	90	8	4	0	H5x3, H12	H3N8
4	Jylland	Levende	blisgås	2	2	0	0	0		
4	Jylland	Levende	bramgås	15	69	0	0	0		
4	Jylland	Levende	dobbeltbekka sin	1	1	0				
4	Jylland	Levende	gråand	12	24	1	0	0		
4	Jylland	Levende	hvinand	1	1	0				
4	Jylland	Levende	krikand	7	20	4	2	0	H5, H6	H1N1
4	Jylland	Levende	pibeand	10	37	4	0	0		H6N2
4	Jylland	Levende	skovsneppe	3	8	0				
4	Jylland	Levende	spidsand	5	9	1	0	0	N8	
4	Jylland	Nedlagt	gråand	35	172	12	1	0	H8x2, H8N4, H8N5, N4	H6N2
4	Jylland	Nedlagt	grågås	1	3	1	0	0		ikke H5/H7
4	Jylland	Nedlagt	krikand	5	25	4	1	0	H6N2	H6N2
4	Jylland	Nedlagt	sneppefugle	1	4	0	0	0		
4	Sjælland	Levende	blisgås	1	1	0	0	0		
4	Sjælland	Levende	bramgås	1	2	0	0	0		
4	Sjælland	Levende	grågås	4	7	0	0	0		
4	Sjælland	Levende	pibeand	7	7	0	0	0		
4	Sjælland	Nedlagt	gråand	10	50	7	2	0	H5, H9	
Ialt				264	973	72	20	1		11

Lokalitet: KBH, Hovedstadsområdet postnr. 1xxx, 2xxx; Sjælland, postnr. 3xxx, 4xxx; Fyn, postnr. 5xxx; Jylland, postnr. 6xxx, 7xxx, 8xxx, 9xxx.

Fangstmetode: Nedlagt, nedlagt fjervildt fra vildthåndteringsvirksomheder; Levende, levende ved prøveudtagelse eller skudt ved jagt umiddelbart forinden.

H5 og H7 LPAI er påvist ved PCR subtypning og HA kløvningssite sekventering.

Subtype på primærmateriale angiver resultatet af HA og NA sekventering på primærmaterialet (RNA oprenset fra kloaksvabere).

AI virusisolater er virus der er isoleret i æg og subtypet ved HI-test/N-test og eller sekventering af HA og NA fra virusisolaterne.

Bilag 3. Virusisolatoversigter

Influenzavirus isolater fra den aktive AI overvågning og fra fjervildtopdræt-overvågningen 2015. Subtype af isolater er fundet ved HI- og N- test og/eller sekventering. Subtype på originalmateriale er fundet ved PCR og/eller sekventering.

H-type	subtype	Art	Prøve-id	Subtype på originalmateriale
H1	H1N1	Knopsvane	15-15855-3w	Ikke H5/H7
	H1N1	Krikand	15-22543-22w	Ikke H5/H7
H3	H3N8	Gråand	15-18397-59w	H12
H5	H5N3	Krikand	15-16946-4w	H5N3
H6	H6N2	Spidsand	15-18119-21w	Ikke H5/H7
	H6N2	Gråand	15-19392-55w	H5 LPAI, H6
	H6N2	Krikand	15-19392-56w	H5 LPAI, H6
	H6N2	Pibeand	15-22546-11w	Ikke H5/H7
	H6N8	Krikand	15-18119-24w	Ikke H5/H7
H10	H10N1	Gråand	15-15901-12w	Ikke H5/H7
	H10N7	Gråand	15-10813-1c	Ikke H5/H7
	H10N7	Gråand	15-11339-1c	Ikke H5/H7
Ikke H5/H7		Grågås	15-23201-4w	Ikke H5/H7

w=vild fugl; c=fjervildtopdræt.

Virus fra overvågningen i vilde fugle 2015 der er isoleret i æg og som ikke var influenza A virus. Typning af PMV isolater med HI-test, samt AI subtype fundet ved PCR direkte på originalmaterialet.

Virus	Art	Prøve-id	AI subtype på originalmateriale
PMV1	Krikand	15-19392-57 p.2	Ikke-H5/H7
PMV6	Gråand	15-16343-29 p.2	Ikke-H5/H7
PMV6	Gråand	15-16343-32 p.2	H7 LPAI
PMV6	Gråand	15-16917-59 p.2	H5 LPAI
PMV6	Pibeand	15-22543-20 p.3	Ikke-H5/H7
Ikke PMV1*	Gråand	15-19846-56 p.2	Ikke H5/H7
Ikke PMV1*	Gråand	15-21255-11 p.2	H5 LPAI
Ikke PMV1*	Gråand	15-21256-22 p.2	Ikke H5/H7

*=typen blev ikke bestemt, udover at det ikke var PMV1 eller AI.

Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 PCR assays

Mismatch mellem virussekvens og primere og prober er markeret med rødt. "----" angiver at sekvens ikke findes.

Virus/primernavn	KHA-1	KHA-3 rev compl.
primersekvens	CCTCCAGARTATGCMYAAAAATTGTC	CARGGMATGGTAGACGGTTGGTA
A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/Eurasian_teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGCTGGTA
A/Eurasian_teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA

Virus/primernavn	H5LH1	H5PRO	H5RH1 rev compl.
primersekvens	ACATATGACTACCCACARTATTTCAG	TCWACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGRTAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	ACATATGACTACCCGAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	ACATATGACTACCCGAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	ACATACGA TTACCCG CAT TATAC AG	TCAAC CG TGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	ACATACGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAAC CG TGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	ACATACGA TTACCCG CAT TATAC AG	TCAAC CG TGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	ACATACGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAAC CG TGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/10-2014(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/Eurasian_teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/Eurasian_teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	ACATACGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	ACATATGA TTACCCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCA AG TTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT

Virus/primernavn	H5CS-240L	H5CS-240ProIno	H5CS-192R rev compl.
primersekvens	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	IGAATGCCCCAAATAYGTGA	TATTTGGRGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	G AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGA ATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/Eurasian_teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/Eurasian_teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/Eurasian_teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC

Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2015.



Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2015.

Der er indgået aftale mellem Fødevarestyrelsen (FVST) og DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) om overvågning af aviær influenza i vilde fugle i 2015 til et samlet budget på 750.000 kr., jf. "Aftale nr. 2 om overvågning af sygdomme og gennemførelse af projekter i 2015 (fugleinfluenza, West Nile Virus, virus i flagermus, resistens, økonomisk analyse af det veterinære beredskab samt overvågningsprogrammer der afregnes efter antallet af prøver)". I henhold til aftalen afholder FVST udgifterne til udtagning af prøver udenfor projektbudgettet i aftalen.

Udgifter til obduktion og PCR-test i den passive overvågning indgår ikke i budgettet men faktureres løbende til FVST Dyresundhed.

Projektet gennemføres i samarbejde mellem Fødevarestyrelsen (FVST), Statens Naturhistoriske Museum, KU (SNM) og Veterinærinstituttet DTU (DTU-VET).

Vildfugleovervågningen i 2015 omfatter:

- 1) En EU koordineret passiv overvågning for højpatogen aviær influenza (HPAI) virus i vilde fugle fundet døde eller syge, i medfør af Kommissionens Afgørelse 2010/367/EU¹.
- 2) En national aktiv overvågning (screening) for lavpatogen aviær influenza (LPAI) virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.
- 3) Molekylær karakterisering af udvalgte virus og gener fra 1) + 2). Der fokuseres på karakterisering af H5 og H7 virus samt H9N2 virus.
- 4) Indsamling af prøver til validering af tørre svabere.

Baggrund

FVST er forpligtet til at overvåge for HPAI virus i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens Afgørelse¹ af 25. juni 2010 (2010/367/EU). Overvågningen er en del af det EU-baserede overvågningsprogram for AI, der har været gennemført siden 2003, og som løbende er blevet justeret.

FVST udfører en national aktiv overvågning for LPAI virus i levende/nedlagte vilde fugle. Overvågningen foretages som en screening for LPAI virus i vildt levende fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza, herunder undersøgelse af nedlagt vildt (fortrinsvist svømmeænder).

Fremgangsmåde

Alle kadavere hhv. prøver, der skal indgå i den passive overvågning (1) og den aktive screening (2), indsendes til DTU-VET førstkommande hverdag efter prøveudtagning.

De sidste prøver i den aktive overvågning skal være modtaget på DTU-VET senest 18. december kl. 10. Der kan maksimalt analyseres ca. 20 pools pr. uge, svarende til max. 100 fugle fra den aktive screening.

1) Passiv overvågning

Formålet med overvågningen er dels at undersøge døde og syge vilde fugle for HPAI virus, dels at få indberetninger om usædvanlig dødelighed og markante sygdomsudbrud hos vilde fugle, der kan være tegn på smitte med aviær influenza.

¹ Kommissionens Afgørelse nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle (2010/367/EU)

Fuglearter omfattet af overvågningen fremgår af bilag 1 til denne aftale.

Veterinærenhederne står for visitering og indsendelse af døde og syge vilde fugle indberettet af borgere.

FVST har etableret en aftale med Naturstyrelsen (NS) om, at der indsamles og indsendes døde vilde fugle fra vildtreservater i fem udvalgte enheder.

Egnede undersøgte fugle indsendt til DTU-VET som faldvildt, indgår også i overvågningen.

Det kan være vanskeligt at sikre det ønskede antal døde vilde fugle, idet antallet varierer meget med årstid, lokalitet og vejrlig, især om vinteren. Ligeledes er det kendt, at døde vilde fugle i løbet af kort tid omsættes i naturen fx af predatorer. Såfremt situationen udvikler i lighed med foråret 2006, hvor der var en epidemi af HPAI i vilde fugle, vil de nødvendige undersøgelser ikke være omfattet af denne overvågningsplan. Skulle en sådan situation forekomme, intensiveres de laboratoriemæssige undersøgelser på en måde og i et omfang, der er tilpasset situationen. Dette aftales særskilt mellem FVST og DTU-VET.

Kadaverne indsendes til DTU-VET og undersøgelsen foretages på en trachealsvaber og en kloaksvaber pr. fugl, disse kan pooles for hver fugl til en samlet prøve pr. fugl.

Tidshorisont, PCR resultat: 3 arbejdsdage efter modtagelse. For faldvildt en samlet maksimal svartid fra fund af en fugl til analyseresultat inkl. patogenicitetsbestemmelse foreligger på 8 arbejdsdage.

Resultatet sigter mod at informere om der påvises HPAI virus.

Tidshorisont, opfølgende virusisolation af H5/H7 positive prøver: op til 4-5 uger efter modtagelse. Virusisolationen igangsættes indenfor 4-5 dage, men kan tage op til 4-5 uger.

2) Aktiv overvågning

Der etableres samarbejde med Ringmærkningscentralen under SNM, om indsamling af prøver bl.a. i forbindelse med ringmærkningsaktiviteter i 2015. De arter, der indsamles prøver fra, udvælges, så de bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle fra fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza, jf. bilag 1. Antallet af fugle/prøver der tilstræbes at indsamle, fremgår af nedenstående tabel. Der tilstræbes en geografisk fordeling af prøver så der i Hovedstadsregionen max. tages 150 prøver.

I fortsættelse af de tidligere års overvågning vil FVST udtage og indsamle prøver fra nedlagte ænder (gråand, krikand, pibeand) og gæs (gerne kortnæbet gås), fortrinsvist i perioden 1/9 – 1/12 2015. Prøverne vil blive udtaget fra ænder og gæs indleveret på vildthåndteringsvirksomheder (Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling, og Klosterheden Vildt).

Prøverne vil blive indsamlet som enkeltprøver i kloakmedie (flerstyrkemedie) og poolet i laboratoriet inden undersøgelse. Såfremt der er behov for analyse af enkeltprøver i en positiv pool, kan enkeltprøverne testes; der foretages alene undersøgelse af enkeltprøverne, hvis poolen giver et uklart resultat, hvilket kan være tilfældet ved tilstedeværelse af flere virus i samme pool.

Pooling i laboratoriet foretages således, at en pool kun indeholder max. 5 svabere indsamlet på samme dato, sted (på postnr. niveau) fra samme fugleart.

Tidshorisont: Primære resultater i løbet af 5 arbejdsdage (influenza A, H5 og H7, H5/H7 LPAI/HPAI) efter modtagelse. Sekundære resultater (subtypning af virusisolater) indenfor 4-5 uger, hvis der er tale om H5 eller H7 subtype og indenfor ca. 2 måneder, for andre H typers vedkommende. Resultaterne afrapporteres i slutrapporten.

Resultat: sigter i første omgang mod at informere om der forekommer H5 eller H7 AI virus samt karakterisering af H5/H7 subtyper m.h.t. patogenicitet. Endvidere en kortlægning af forekomsten af andre subtyper AI virus i vilde danske fugle.

3) Molekylær karakterisering

Diversiteten af AI virus er stor og identifikation af specifikke virus-varianter kræver en nærmere karakterisering af virus, som giver mere information end subtypen. Formålet er hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af H7N9-China like virus, hurtig karakterisering af H5 virus, karakterisering af H5 og H7 virus med henblik på evaluering af egnetheden af de anvendte RT-PCR assays til H5/H7 subtypning, subtypebestemmelse af ikke-H5/H7/H9 virus.

Udover virus fra vilde fugle, karakteriseres øvrige AI virus som er identificeret i fjerkræbesætninger mv. i forbindelse med fx AI mistanker og overvågningen i afkom fra opdrættet fjervildt.

Tidshorison: identifikation af H7N9-China virus ca. 5 arbejdsdage efter påvisning af H7. Resultatet af øvrige analyser rapporteres i slutrapporten.

4) Indsamling af prøver til validering af tørre svabere

Formålet er at indsamle prøver som kan anvendes til validering af anvendelsen af tørre svabere som alternativ til at udtage prøver direkte i AI medie i felten. Der udarbejdes separat vejledning til prøveudtagelse.

Tidshorison: resultatet afrapporteres i slutrapporten.

Laboratoriemæssige undersøgelser

DTU-VET udfører alle analyser. De laboratoriemæssige procedurer for den passive (1) og aktive (2) overvågning er i overensstemmelse med Kommissionens Afgørelse¹ og den diagnostiske manual (Beslutning 2006/4377/EU). Ikke alle metoder til uddybende molekylær karakterisering (3) er beskrevet i den diagnostiske manual. Det ønskede prøveantal fremgår af nedenstående skema.

1) Overvågning og tidlig påvisning af HPAI virus i døde vilde fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5- og H7-positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages opfølgende virusisolation af H5/H7 positive prøver. Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-typning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering.

2) Screening for LPAI virus i levende vilde fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza inkl. undersøgelse af nedlagte fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5/H7 positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages virusisolation på pan-influenza positive prøver.

Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-subtypning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering.

3) Molekylær karakterisering

Udvalgte prøver fra den passive og aktive overvågning karakteriseres med sekvensanalyse og/eller RT-PCR af HA og evt. NA og øvrige gener. Der sigtes primært på karakterisering af H5, H7 og H9N2 virus, sekundært på subtypebestemmelse af øvrige AI virus fundet i den passive og aktive overvågning (1,2).

4) Validering af tørre svabere

Ca. 100 fugle fra vildthåndteringsvirksomheder (2) testes parallelt med tørre kloaksvabere og med standardmetoden, som er kloaksvabere udtaget i AI kloakmedie (flerstyrkemedie). Prøverne udtages først med tørre svabere og dernæst i AI-medie til sammenligning.

Sidste år blev tørre svabere testet ved først at tage en almindelig våd svaber og derefter en tør svaber på 100 fugle.

Samme metode som 2).

Løbende orientering om forløb

I 2. halvår indkalder FVST ved behov til møder (evt. i form af telefon- eller videolinkmøde) mellem FVST, SNM og DTU-VET om status på prøveantal, fund, eventuelle omfordelinger hvis det forventede antal fugle indenfor formålene ikke kan opnås, etc. Ved fravær af møder orienterer parterne hinanden pr. mail månedligt.

Afrapportering

DTU-VET sender resultaterne af den passive overvågning til FVST i form af laboratoriesvar og indtaster endvidere resultaterne i databasen for "Prøveresultater for fugleinfluenza". Resultaterne er hermed tilgængelige på den offentlige vildfugleoversigt på FVST hjemmeside.

FVST foretager de ½-årige pligtige afrapporteringer til EU ultimo juli 2015 og ultimo januar 2016.

DTU-VET udarbejder en samlet slutrapport med resultaterne af den passive og aktive overvågning. Slutrapporten foreligger på dansk senest medio marts 2016.

FVST orienteres straks ved fund af HPAI virus. Fund af LPAI H7N9-China-2013 afrapporteres ligeledes hurtigst muligt, men kræver molekylær karakterisering og kan tage op til 5 arbejdsdage fra påvisning af H7 subtype.

Oversigt over antal fugle og prøver i overvågning af AI i vilde fugle i Danmark 2015*

Opgave	Antal fugle	Antal prøver (pools)
<i>Aktiv overvågning i levende vilde fugle</i>		
SNM	500	170
FVST veterinærenheder (nedlagt fjervildt)	500	120
I alt	1000	290
	Antal fugle (estimeret)	Antal prøver (estimeret)
<i>Passiv overvågning i døde vilde fugle</i>		
DTU-VET (faldvildt)		
NS		
FVST, Veterinærenheder		
I alt	25	25

*DTU-VET modtager hele budgetbeløbet, selvom der modtages færre prøver end planlagt. En sådan situation skal dog søges undgået ved løbende omfordelinger, hvis der er noget, der tyder på, at det forventede antal fugle indenfor den passive og aktive overvågning ikke kan opnås.

Kontaktpersoner

Lars E. Larsen og Charlotte K. Hjulsgaard, DTU-VET.

Sten Mortensen og Birgitte Beck Jørgensen, FVST.

Kasper Thorup og Jesper Johannes Madsen, SNM.

BILAG 1

Liste² over arter af vilde fugle, der skal gøres til genstand for målrettet prøveudtagning og testning for aviær influenza (målarter)

Nr.	Videnskabeligt navn	Almindeligt anvendt navn
1.	<i>Accipiter gentilis</i>	Duehøg
2.	<i>Accipiter nisus</i>	Spurvehøg
3.	<i>Anas acuta</i>	Spidsand
4.	<i>Anas clypeata</i>	Skeand
5.	<i>Anas crecca</i>	Krikand
6.	<i>Anas penelope</i>	Pibeand
7.	<i>Anas platyrhynchos</i>	Gråand
8.	<i>Anas querquedula</i>	Atlingand
9.	<i>Anas strepera</i>	Knarand
10.	<i>Anser albifrons albifrons</i>	Blisgås (europæisk underart)
11.	<i>Anser anser</i>	Grågås
12.	<i>Anser brachyrhynchus</i>	Kortnæbbet gås
13.	<i>Anser erythropus</i>	Dværggås
14.	<i>Anser fabalis</i>	Sædgås
15.	<i>Ardea cinerea</i>	Fiskehejre
16.	<i>Aythya ferina</i>	Taffeland
17.	<i>Aythya fuligula</i>	Troldand
18.	<i>Branta bernicla</i>	Knortegås
19.	<i>Branta canadensis</i>	Canadagås
20.	<i>Branta leucopsis</i>	Bramgås
21.	<i>Branta ruficollis</i>	Rødhalset gås
22.	<i>Bubo bubo</i>	Stor hornugle
23.	<i>Buteo buteo</i>	Musvåge
24.	<i>Buteo lagopus</i>	Fjeldvåge
25.	<i>Cairina moschata</i>	Moskusand
26.	<i>Ciconia ciconia</i>	Hvid stork
27.	<i>Circus aeruginosus</i>	Rørhøg
28.	<i>Cygnus columbianus</i>	Pibesvane
29.	<i>Cygnus cygnus</i>	Sangsvane
30.	<i>Cygnus olor</i>	Knopsvane
31.	<i>Falco peregrinus</i>	Vandrefalk
32.	<i>Falco tinnunculus</i>	Tårnfalk
33.	<i>Fulica atra</i>	Blishøne
34.	<i>Larus canus</i>	Stormmåge

² Liste fra Kommissions beslutning nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle

35. | *Larus ridibundus* | Hættemåge |
36. | *Limosa limosa* | Stor kobbersnepe |
37. | *Marmaronetta angustirostris* | Marmorand | (findes ikke i DK)
38. | *Mergus albellus* | Lille skallesluger |
39. | *Milvus migrans* | Sort glente | (sjælden i DK)
40. | *Milvus milvus* | Rød glente |
41. | *Netta rufina* | Rødhovedet and |
42. | *Phalacrocorax carbo* | Skarv |
43. | *Philomachus pugnax* | Brushane |
44. | *Pica pica* | Husskade |
45. | *Pluvialis apricaria* | Hjejle |
46. | *Podiceps cristatus* | Toppet lappedykker |
47. | *Podiceps nigricollis* | Sorthalset lappedykker |
48. | *Porphyrio porphyrio* | Sultanhøne | (findes ikke i DK)
49. | *Tachybaptus ruficollis* | Lille lappedykker |
50. | *Vanellus vanellus* | Vibe |